

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 60-078578

(43)Date of publication of application : 04.05.1985

(51)Int.Cl.

C12N 9/02
//(C12N 9/02
C12R 1:07)

(21)Application number : 58-186382

(71)Applicant : UNITIKA LTD

(22)Date of filing : 04.10.1983

(72)Inventor : NAGATA KAZUHIKO
SHIRAI HIROMASA
SAIKI MIHOKO
MATSUO TAKAAKI

(54) METHOD FOR PURIFYING DIAPHORASE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain easily diaphorase in high purity, by bringing a crude enzymic solution, containing the diaphorase, and obtained from microbial cells into contact with a specific adsorbent solid support for the diaphorase under high salt concentration conditions, and eluting the adsorbed diaphorase.

CONSTITUTION: A crude enzymic solution, containing diaphorase, and obtained from microbial cells, preferably *Bacillus stearothermophilus* is brought into contact with a specific adsorbent solid support, preferably a water-insoluble solid support containing Reactive Blue 2 (C.I. No.61211) as a ligand, under high salt concentration conditions to adsorb the diaphorase on the adsorbent solid support. The adsorbed diaphorase is then eluted with a buffer solution of 7W9pH containing 0.5W1mM NADH (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide) or NADPH (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

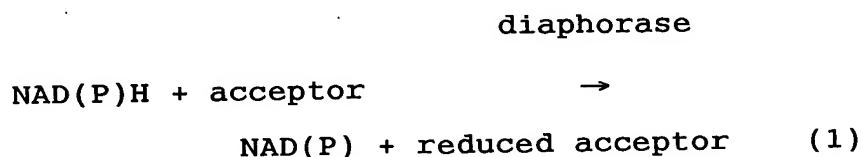
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

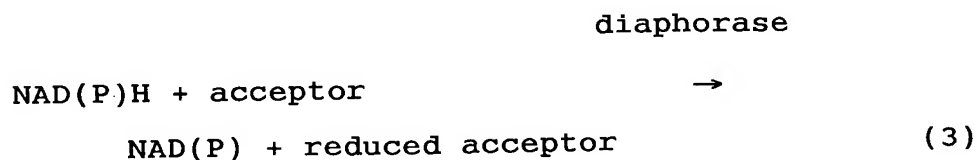
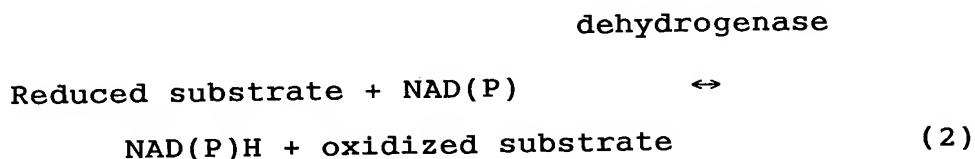
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

Diaphorase is an enzyme which catalyzes the oxidation of NAD(P)H in the presence of an acceptor as represented by the following formula (1):



wherein NAD(P) represents NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) or NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); and NAD(P)H represents NADH (reduced NAD) or NADPH (reduced NADP). This enzyme is also referred to as NAD(P)H: acceptor oxidoreductase, which has been extensively utilized as one reagent for laboratory tests, in particular. Specifically, the laboratory test is carried out by a method in which, as is illustrated by the following formulae (2) and (3), an altered amount of a target substance to be quantitatively determined is derivatized to the altered amount of NAD(P)H (formula (2)) followed by reducing an acceptor utilizing diaphorase (formula (3)), and the degree of coloration thereby is colorimetrically determined with a visible light.



There is also a method in which the altered amount of NAD(P)H is directly measured at 340 nm in the ultraviolet ray

region without utilizing diaphorase (utilizing the formula (2)), however, accurate quantitative determination of the target substance is difficult in instances where equilibrium of the reaction for derivatizing the altered amount of the target substance to the altered amount of NAD(P)H is not shifted toward production of NAD(P)H. To the contrary, a diaphorase reaction is almost irreversible, therefore, through combined use of the diaphorase reaction at the final step of the reaction system (formula (3)), the reaction proceeds to the intended orientation to enable accurate quantitative determination of the target substance. Further, when a dye stuff having a great molecular extinction coefficient is used as an acceptor, sensitivity is increased accordingly. Thus, diaphorase is an important enzyme in laboratory tests, and its demand has increased in recent years.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭60-78578

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)5月4日

C 12 N 9/02
//C 12 N 9/02
C 12 R 1:07

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 ジアホラーゼの精製法

⑯ 特 願 昭58-186382

⑰ 出 願 昭58(1983)10月4日

⑱ 発 明 者 永 田 和 彦 長岡京市城の里15-12
⑱ 発 明 者 白 井 宏 政 宇治市宇治里尻32
⑱ 発 明 者 永 来 美 保 子 京都府相楽郡山城町大字平尾小字綾杉河原21
⑱ 発 明 者 松 尾 隆 明 城陽市寺田深谷7-146
⑲ 出 願 人 ユニチカ株式会社 尼崎市東本町1丁目50番地

明 細 書

1. 発明の名称

ジアホラーゼの精製法

2. 特許請求の範囲

(1) 微生物菌体から得たジアホラーゼ含有粗酵素溶液を、ジアホラーゼの特異的吸着担体に高塩濃度下に接触させて、ジアホラーゼを該吸着担体に吸着させ、ついで吸着したジアホラーゼを溶離することを特徴とするジアホラーゼの精製法。

(2) 微生物菌体がバチルス・ステアロサーモフィルスである特許請求の範囲第1項記載の精製法。

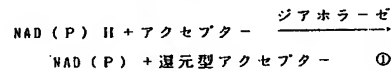
(3) ジアホラーゼの特異的吸着担体がリアクティブブルー2(カラーインデックス番号G1211)をリガンドとする水不溶性担体である特許請求の範囲第1項記載の精製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、ジアホラーゼの精製法に関するものであり、さらに詳しくは微生物菌体からのジアホラーゼを高塩濃度下にてアフィニティクロマトグ

ラフィーを行うことにより、簡単にかつ高純度に精製する方法に関するものである。

ジアホラーゼは、次式①

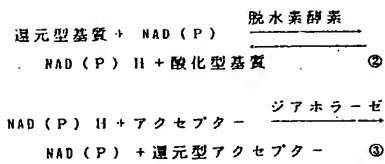


(NAD(P)は、NAD(ニコチンアミドアデニンジスクレオチド)あるいはNADP(ニコチンアミドアデニンジスクレオチドリリン酸)を表し、NAD(P)Hは、NADH(還元型NAD)あるいはNADPH(還元型NADP)を表す。)

のようにアクセプターの共存下でNAD(P)Hの酸化を触媒する酵素で、NAD(P)H:アクセプターオキシドレダクターゼとも呼ばれており、特に臨床検査用試薬の一つとして広く利用されている。具体的には下記②、③式のように目的定量物の変化量をNAD(P)Hの変化量に導いた(②式)のち、ジアホラーゼを利用してアクセプターを還元し(③式)、その呈色の度合を可視光で比色定量する方法である。

We translated here.

特開昭60-78578(2)



ジアホラーゼを利用しないで直接 NAD(P)H の変化量を紫外線領域の 340nm にて測定する方法 (②式を利用) もあるが、目的定量物の変化量を NAD(P)H の変化量に導く反応の平衡が NAD(P)H 生成の方向に向いていない場合には、目的物質の性格な定量は困難である。一方、ジアホラーゼの反応はほとんど不可逆的であるので、反応系の最後にジアホラーゼの反応 (③式) を組合せることにより、反応が目的の方向に進み、目的物質の定量を正確に行うことができる。さらにアクセプターとして分子吸光係数の大きな色素を用いれば、それだけ感度も増大する。このように、ジアホラーゼは臨床検査において重要な酵素であり、その需要が近年増加している。

従来、微生物菌体よりジアホラーゼを採取するには、菌体を破砕後、塩あるいは界面活性剤を含む溶液などで抽出し、核酸の除去、硫酸アンモニウムを用いた塩析による分画などを行った後、種々の担体を用いたカラムクロマトグラフィーが実施されていた。特にカラムクロマトグラフィーとしては、イオン交換クロマトグラフィー例えば DEAE (ジエチルアミノエチル) - 又は TEAE (トリエチルアミノエチル) - セルロース、吸着クロマトグラフィー例えばハイドロキシアパタイトあるいはゲル透過クロマトグラフィー例えば適度に架橋したデキストランゲル又はポリアクリルアミドゲルなどを種々組み合せるといった煩雑な工程をへていた。そのため、製品としてのジアホラーゼを得るまでに日数がかかるだけでなく、クロマトグラフィーの回数がふえることによりジアホラーゼの回収率の低下が生じていた。さらに、菌体よりのジアホラーゼ抽出液中には菌体由来の種々の物質が混在しているがため、上述のような工程によってもなお高純度のジアホラーゼを得るのはかなり

困難であった。例えば *Clostridium kluyveri* からのジアホラーゼは Archives of Biochemistry and Biophysics, 132 巻, 91 頁, 1969 年に記載されているように、その工業生産品には多量の異種蛋白質が含有されているがため、この工業生産品をさらにゲル透過クロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーにより精製を行っている。その結果、精製度で 30 倍向上しているが、それでも 90% 程度の純度までしか純化されていない。

最近、Mains らは *Bacillus stearothermophilus* からのジアホラーゼの精製について報告した (The Biochemical Journal, 191 巻, 457 頁, 1980 年)。すなわち、菌体を破砕後、塩化ナトリウムを加え 70℃ で処理し、次いでクロマトグラフィーとして DEAE-セルロースクロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー及び Cibacron Disc 3GA (リアクティブブルー-2 の Ciba-Geigy 社登録商標) - アガロースクロマトグラフィーを行い精製を行っている。しかしながら、それでもまだ少量の異種蛋白質の残存が認められている。

このようにジアホラーゼの精製は煩雑で、かつ高純度のものを得るのは困難であるからジアホラーゼは製造費が高くつき、臨床検査用試薬としての重要性が言われているもののその利用に著しい支障となっている。それゆえに、高純度のジアホラーゼを効率よく、かつ工業的な規模で取得する方法の確立が強く要望されている。

本発明者らは、これらの観点から、簡単な精製操作で高純度のジアホラーゼを効率よく得る方法を提供することを目的として鋭意研究した結果、クロマトグラフィーとして高塩濃度下でアフィニティクロマトグラフィーを行うだけで、上記の目的がすべて達成されることを見出し、本発明に到達したものである。

すなわち、本発明は微生物菌体から得たジアホラーゼ含有粗酵素溶液を、ジアホラーゼの特異的吸着担体に高塩濃度下に接触させて、ジアホラーゼを該吸着担体に吸着させ、ついで吸着したジアホラーゼを溶離することを特徴とするジアホラーゼの精製法である。

特開昭60-78578(3)

本発明に用いられる微生物菌体としては、ジアホラーゼ生産能を持つ微生物菌体であればいいものでも利用でき、起源を限定するものではないが、工業的には耐熱性ジアホラーゼを大量に産出する *Bacillus stearothermophilus* が好ましい。これらの微生物菌体から得たジアホラーゼ含有粗酵素溶液としては、たとえば菌体を水あるいは緩衝液に懸濁させ、自己消化法、凍結溶解法、ホモジナイザー法、摩砕法、高圧法あるいは浸透圧ショック法などで破砕し、遠心分離して得た上清液を用いればよい。また、このものをさらに硫酸プロタミン、硫酸ストレプトマイシン、ポリエチレンジアミン、水性二相分配法などで除核酸処理して得た溶液を用いてもよく、またはさらに硫酸アンモニウム分画、pH処理、熱処理などを行った溶液を用いてもよい。

このようにして得たジアホラーゼ含有粗酵素溶液と、ジアホラーゼの特異的吸着担体とを高塩濃度下で、単に混合するか、あるいはカラムに充填した上記担体に通液することによりジアホラーゼ

を上記担体に特異的に吸着させることができる。この際、ジアホラーゼ以外の異種蛋白質を担体に吸着させないために、できるだけ高塩濃度下で行うことが必要である。そのためには、例えば好ましくは0.5Mから飽和濃度、特に好ましくは1Mから飽和濃度の塩類をあらかじめジアホラーゼ含有粗酵素溶液に加えて使用すればよい。用いられる塩としては、例えば塩化イオン、臭化イオン、硫酸イオン、リン酸イオン、酢酸イオン、炭酸イオン、ホウ酸イオンなどの陰イオンと、例えばナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、マグネシウムなどの陽イオンを適宜組合せたものがあげられるが、通常は塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸アンモニウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウムなどが適している。

次に、本発明においては担体に吸着させたジアホラーゼを担体より溶離させることが必要である。そのためには、まずジアホラーゼが吸着した担体を好ましくは0.5Mから飽和濃度、特に好ましくは1Mから飽和濃度の上述の塩類を含有する

緩衝液で洗浄し、担体に吸着していない異種蛋白質を除いておくことが望ましい。この緩衝液のpHは5~10、特に6~9、さらには7~9であることが好ましい。このようにして洗浄した後、たとえば以下に述べる溶離液を用いてジアホラーゼを溶離することで、きわめて純度の高いジアホラーゼを得ることができる。溶離液としては、例えば好ましくは0.2mM~10mM、特に好ましくは0.5mM~1mMのNADHあるいはNADPHを含有する緩衝液が用いられる。この緩衝液のpHは5~10、特に6~9さらには7~9であることが好ましい。また、溶離させる方法としては、緩衝液を一度に加える、いわゆる回分式溶出法でもよいし、あるいは緩衝液の濃度を連続的に上昇させて溶離させる、いわゆる濃度勾配溶出法でもよい。

本発明に用いられるジアホラーゼの特異的吸着担体としては、例えば色素化合物を水不溶性担体に結合させたものであって、ジアホラーゼを特異的に吸着するものであれば、いかなるものでもよい。これらの中でもリアクティブブルー-2（カラ

-インデックス番号 61211）をリガンドとする水不溶性担体が好ましい。この水不溶性担体としては、例えばセルロース、デキストラン、アガロース、デンプンなどの多糖類の誘導体、ポリ酢酸セルロース、ポリビニルアルコールの誘導体、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリビニルクロライド、ポリ（メチルメタクリル酸）エステル、ポリブテン、ポリペンテン、ポリビニリデンクロライド、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリル酸、ポリアクリル酸、ポリアミノスチレン、ポリブタジエン、ポリイソブレン、ポリマレイン酸モノエステル、架橋ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルアミン、ポリ（ジアルキルアミノエチルメタクリル酸エステル）、ポリ（ジアルキルアミノメチルスチレン）、ポリ（ビニルピリジン）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリアクリル酸無水物、ポリメタクリル酸無水物、ポリマレイン酸無水物、ポリメタクリロニトリル、ポリ（トリフルオロエチレン）、ポリ（テトラフルオロエチレン）、ポリ（ジビニルベンゼン）、

特開昭60-78578(4)

ポリ(α-メチルスチレン)、ポリ(N-ビニルアミン)、ポリ(テトラメチレングリコールジビニルエーテル)、ポリビニルスルホン、ポリビニルスルホキシド、ポリアクロレイン、ポリメチルビニルケトンなどの不飽和炭素を含む単量体からなる重合体、ポリフェニレンオキシド、ポリメチレンオキシドなどのポリエーテル類、ポリテトラメチレンオキシドなどのポリエーテル類、ポリアラニン、ポリフェニルアラニンなどのポリペプチド類、ナイロン-3、ナイロン-4、ナイロン-5、ナイロン-6、ナイロン-7、ナイロン-11、ナイロン-12、ナイロン-6.6、ナイロン-6.10、ポリ(m-フェニレン-イソフタラミド、ポリ(p-フェニレン-テレフタラミド)などのポリアミド、テレフタル酸、イソフタル酸、アジピン酸、マレイン酸、フマル酸、トリメリット酸などのポリカルボン酸と、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、ペンタエリスリトール、ビスフェノールAなどのポリオールとから誘導されるポリエステル類、グリ

コール類、乳酸、ヒドロキシビリバリン酸などから誘導されるポリエステル、ジメチルポリシロキサン、メチルフェニルポリシロキサン、メチルビニルポリシロキサン、シアノアルキルメチルポリシロキサン、フルオロアルキルメチルポリシロキサンなどのシリコンゴム、トリエンジイソシアネート、キシレンジイソシアネート、フェニレンジイソシアネート、エチレンジイソシアネートジフェニルメタンジイソシアネート、トルエントリイソシアネートなどのポリイソシアネートと、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール両末端にOH基を有するポリエステルなどのポリオールとから誘導されるポリウレタン類、フェノール-ホルムアルデヒド樹脂、キシレン-ホルムアルデヒド樹脂、尿素-ホルムアルデヒド樹脂、メラミン-ホルムアルデヒド樹脂などのホルムアルデヒド樹脂、ポリイミド、ポリベンツイミドゾール、ポリチアゾールなどの4員環を含むポリマー、ポリカーボナート、ポリスルホンなどの合成ポリマー類及びガラス、アスベスト、クレイ、マイカ、

ヒドロキシルアパタイト、活性炭、シリカゲル、アルミナなどの無機物の誘導体及びポリフォスファゼンのような合成無機ポリマーなどがあげられる。特に、これらの中でもセルロース、デキストラン、アガロース、デンプンなどの多糖類の誘導体が好ましい。このジアホラーゼの特異的吸着担体を得るには、例えばbiochim. biophys. acta 358, 1~13(1974)に記載されている方法によって色素化合物を水不溶性担体に結合させればよい。

特に好ましい具体例として、たとえば市販のマトレックスブルーA(アミコン社製)、アフィゲルブルー(バイオラッド社製)、ブルーセファロースCL-6B(ファルマシア社製)があげられる。

本発明によれば簡便な操作にて、かつ公知のいづれの方法と比べても、収率及び純度ともに高いジアホラーゼを経済的に得ることができる。またアフィニティークロマトグラフィーを行うには、通常緩衝液の種類、濃度、pHなどを考慮する必要があり、そのため定まった緩衝液であらかじめ透析処理などを行う必要があったが、本発明ではそ

のような煩雑な処理は必要なく、塩を加えるだけでよい。

以下、実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明する。

なお、ジアホラーゼの酵素活性は、0.06mMの2,6-ジクロロフェノールインドフェノール及び1mMのNADHを含む20mMのリン酸緩衝液(pH 7.5)にジアホラーゼを加えたときの600nmの吸光度の単位時間当りの減少量の測定より求めたものであり、1マイクロモルの2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを減少せしめる酵素活性を1単位とした。

実施例1、比較例1

バチルス・ステアロサーモフィルス(株)の湿菌体1kgを、2Mの塩化カリウムと2mMの2-メルカプトエタノールを含む25mMのリン酸緩衝液(pH 7.5)2ℓに懸濁し、グイノミル(Willy A. Bachofen Manufacturing Engineers社製)を用いて細胞を破壊した後、遠心分離により不溶物を除去し、ジアホラーゼ含有粗酵素溶液を得た。この粗酵素溶

特開昭60-78578(5)

液をマートレックスブルー-A (Amicon社製) を充填した内径 4.4cm、高さ 25cmのカラムに通じ、ついで 2 Mの塩化カリウムを 2 mMの 2-メルカプトエタノールを含む 25mMのリン酸緩衝液 (pH 7.5) 1 ℓ を通液することにより、非吸着の異種蛋白質を完全に除いた後、ひきつづき上記緩衝液と 2 mMの NADHを含む緩衝液とを用いた直線濃度勾配法にて溶出を行ったところ、0.5mMの NADH濃度近くに目的のジアホラーゼが溶出した。このようにして得たジアホラーゼは、収量 78mg、収率 96%であり、比活性はジアホラーゼ 1 mgあたり 3,800単位であった。また、アクリルアミドディスク電気泳動で単一なバンドを示した。

比較のため、上記と同様にして得たジアホラーゼ含有粗酵素溶液を、2 mMの 2-メルカプトエタノールを含む 25mMのリン酸緩衝液 (pH 7.5) にて十分透析後、あらかじめ同緩衝液にて平衡化しておいたマートレックスブルー-A 充填カラム (内径 4.4cm、高さ 25cm) に通じた。この際、非吸着溶出液中及びつづき 2-メルカプトエタノールを含むリン

酸緩衝液 (pH 7.5) による洗浄操作の吸着溶出液中に、カラムへ供給したジアホラーゼ活性のおよそ 30%ものジアホラーゼ活性が認められた。ひきつづき同緩衝液と 2 mMの NADHを含む緩衝液とを用いた直線濃度勾配法にて溶出を行ったところ、0.4 mMの NADH濃度近くにジアホラーゼが溶出した。収率は 60%、比活性はおおよそ 520単位/mgであり、またアクリルアミドディスク電気泳動ではジアホラーゼ及びこれ以外の多数の異種蛋白質のバンドが認められた。

以上のように、2 Mの塩化カリウム存在下でクロマトグラフィーを行うことにより、通常の方法に比べて驚くほどの精製効率が達成できた。

実施例 2、比較例 2

バチルス・ステアロサーモフィルスの凝固体 500 gを 0.1Mのリン酸緩衝液 (pH 7.2) 2 ℓ に懸濁し、フレンチプレスを用いて細胞を破壊した後、遠心分離により不溶物を除去し、ジアホラーゼを含む上清液を得た。この上清液 2 ℓ 当り 1 % 硫酸プロタミン水溶液 1 ℓ を添加し、十分攪拌し

た後、生じた沈殿を遠心分離により除去し、プロタミン処理上清液を得た。この上清液に 1 Mの硫酸アンモニウムを添加した後、ブルーセファロース CL-6B (Farmacia社製) 充填した内径 4.4cm、高さ 10cmのカラムに通じ、ついで 1 Mの硫酸アンモニウムを含む 0.1Mのリン酸緩衝液 (pH 7.2) を通液した。ひきつづき 1 mMの NADHを含む 0.1Mリン酸緩衝液にてジアホラーゼを溶出させた。このようにして得たジアホラーゼは、収量 36mg、収率 90%であり、比活性は 3,600単位/mgで、アクリルアミドディスク電気泳動で単一なバンドを示した。

比較のため、上記のプロタミン処理上清液を 0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) にて透析後、あらかじめ同緩衝液にて平衡化しておいたブルーセファロース CL-6B 充填カラム (内径 4.4cm、高さ 10cm) に通液し、ついで 1 Mの硫酸アンモニウムを含む 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) を通液した。これらの操作によりカラムへ供給したジアホラーゼ活性のおよそ 22%が流出した。ひきつづき 1 mMの NA

DHを含む 0.1Mリン酸緩衝液をカラムに通液し、吸着しているジアホラーゼを溶出させた。得られたジアホラーゼは収率 55%、比活性は 2,100 単位/mgであり、アクリルアミドディスク電気泳動で多数のバンドが認められた。

特許出願人 ユニチカ株式会社